

チオ硫酸を電子供与体とするダイズ根粒菌の化学独立栄養生育の解析

著者	増田 幸子
号	8
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第204号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60091

	ますだ さちこ
氏 名（本 籍 地）	増田 幸子
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 204 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 (博士課程) 生態システム生命科学専攻
論 文 題 目	チオ硫酸を電子供与体とするダイズ根粒菌の化学独立栄養 生育の解析
博士論文審査委員	(主査) 教 授 南澤 究 教 授 東谷 篤志 准教授 永田 裕二

根粒菌は、マメ科植物の根に共生し、分子状窒素をアンモニアに変換して植物体に供給する共生窒素固定能を持つ土壌細菌である。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* は、農業的価値の高い細菌であるため、共生細菌としての側面からの研究が主であり、土壌環境下での生態に関する知見は乏しい。ダイズ根粒菌は、pH、温度、水分、栄養状態などが絶えず変化する土壌環境に適応して初めて宿主と共生することを考慮すると、土壌環境下でのエネルギー獲得戦略の理解は重要であり、接種根粒菌の土壌での生残の改善を通じて、共生窒素固定の増加につながることも期待される。

2002 年に、ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株の全塩基配列が決定され (Kaneko *et al.* 2002)、ゲノム上には、呼吸 (8 種類のオキシダーゼ、硝酸呼吸、ヒドロゲナーゼ、CO レダクターゼ) やエネルギー代謝 (イオウ酸化、C1 代謝、芳香族化合物分解) などに関わる様々な遺伝子が見出された。これらの多くは共生というよりはむしろ土壌環境下でのエネルギー獲得に関与していると考えられている (Göttfert *et al.* 2005、 Ito *et al.* 2006)。

多くの細菌は、電子供与体および炭素源としてアミノ酸や有機酸、芳香族化合物など様々な有機化合物を利用する従属栄養 (Heterotroph) である。しかし、一部の細菌は電子供与体として無機化合物、炭素源として二酸化炭素を利用する化学独立栄養 (Chemolithoautotroph) 能を持つ。

一般的に *B. japonicum* は、糖や有機酸を添加した培地でよく生育することから、従属栄養細菌として分類された (Vincent *et al.* 1974)。しかし、一部の菌株は水素 (Hanus *et al.* 1980、 Lepo *et al.*, 1980) および一酸化炭素 (Lorite *et al.* 2000) を電子供与体とする化学独立栄養能を持つ。

無機イオウ化合物を電子供与体とする化学独立栄養に関する研究は、極限環境細菌を対象として遺伝学的および生化学的な研究が進んでおり、イオウ酸化細菌 *Paracoccus pantotrophus* GB17 株で、無機イオウ化合物の酸化に関わる *sox* 遺伝子群が同定されている (Wodara *et al.*, 1997)。*sox* 遺伝子群により酸化される無機イオウ化合物の中で、チオ硫酸は多くのイオウ酸化細菌が共通して酸化できる基質であり (Mukhopadhyaya *et al.* 2000)、また、イオウ循環の観点から、チオ硫酸とそれを代謝する細菌の役割は非常に重要であると考えられている (Jørgensen 1990.)。

本研究の目的は、(1) ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株のゲノム情報を用いた無機イオウ化合物酸化に関わる *sox* ホモログの探索、(2) *B. japonicum* USDA110 株のチオ硫酸酸化能と、チオ硫酸酸化に関わる *sox* ホモログの解析、(3) *Bradyrhizobiaceae* 科細菌におけるチオ硫酸酸化能と *sox* ホモログの分布、(4) チオ硫酸を電子供与体とする化学合成無機栄養条件下での二酸化炭素固定能の解析、である。以上を明らかにすることで、*B. japonicum* USDA110 株における、今まで見過ごされてきた環境細菌としての生存戦略の一端や、田畑の土壌細菌のイオウ酸化能、イオウ循環を解明する手がかりが得られると考えられる。

P. pantotrophus GB17 株 (Wodara *et al.*, 1997)、*Allochromatium vinosum* DSM180^T 株 (Hensen *et al.*, 2006)、および *Chlorobium tepidum* TLS 株 (Elsen *et al.*, 2002) の *sox* 遺伝子群のアミノ酸配列を基に BLASTP 相同検索を行い、*B. japonicum* USDA110 株のゲノム上の *sox* ホモログを探索した。その結果、ゲノム上の 4 か所に複数の *sox* ホモログが見出され、本研究では、それぞれ *sox* locus I (*sox*TRSVWX₁Y₁Z₁A₁B₁C₁D₁)、II (*sox*X₂Y₂Z₂A₂KB₂)、III (*sox*A₃Z₃Y₃F)、IV (*sox*C₃D₃) と定義した。また、*B. japonicum* USDA110 株の *sox* locus I の *sox* ホモログは、*P. pantotrophus* GB17 株の *sox* 遺伝子群と、*sox* locus II の *sox* ホモログは *C. tepidum* TLS 株、*A. vinosum* DSM180^T 株の *sox* 遺伝子群とそれぞれ高い相同性を示した。

B. japonicum USDA110 株が、チオ硫酸を電子供与体とする化学合成無機栄養生育が可能か否か調べた。チオ硫酸酸化による pH 低下を指標としたプレートアッセイ法により、*B. japonicum* USDA110 株は、既知のイオウ酸化細菌と比較して、低濃度域 (4 mM) のチオ硫酸のみ酸化できることが示唆された。次に、*B. japonicum* USDA110 株を、チオ硫酸を電子供与体とする化学合成無機栄養で液体培養を行った。その結果、細胞増殖とそれに伴うチオ硫酸の減少が観察され、1 mol のチオ硫酸に対し 2 mol の硫酸生成が認められた。電子供与体としてチオ硫酸、炭素源および電子供与体としてコハク酸を添加した混合栄養においても、細胞増殖とチオ硫酸酸化が観察された。しかし、高濃度 (20 mM) のチオ硫酸を添加した混合栄養では、細胞増殖は抑制された。したがって、この濃度では、チオ硫酸、もしくはチオ硫酸酸化による副産物が細胞増殖を抑制していると考えられた。

Sox システムの中で、SoxY はチオ硫酸酸化の鍵酵素と考えられている (Friedrich *et al.*, 2005、Friedrich *et al.*, 2008)。そこで、*soxY* 遺伝子破壊株を構築し、細胞増殖とチオ硫酸酸化に与える影響を観察した。その結果、化学合成無機栄養において、*soxY₂* mutant は野生株と同じ表現型を示したが、*soxY₁* mutant では細胞の増殖とチオ硫酸酸化は認められなかった。したがって、チオ硫酸酸化には少なくとも *soxY₁* 遺伝子が必須であることが示された。また、*soxY₁* mutant を 20 mM のチオ硫酸を添加した混合栄養で培養すると、細胞の増殖が観察された。したがって、野生株で観察された細胞増殖の抑制は、チオ硫酸そのものではなく、微量なチオ硫酸酸化による副産物により引き起こされている可能性が考えられた。

また、チオ硫酸酸化による電子授受の有無を、チオ硫酸依存的な酸素消費の測定により検討した。その結果、野生株および *soxY₂* mutant では、チオ硫酸依存的な酸素消費を測定したが、*soxY₁* mutant では検出されなかった。また、野生株では 1 mol のチオ硫酸に対し 2 mol の酸素消費が観察された。したがって、*B. japonicum* USDA110 株のチオ硫酸酸化は、化学反応式 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}^+$ に沿って起きていると考えられた。

Bradyrhizobiaceae 科細菌における、チオ硫酸酸化能と *sox* locus I の分布を、pH 低下を指標としたプレートアッセイ法および *B. japonicum* USDA110 株の *sox* ホモログをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションにより調べた。その結果 Bradyrhizobiaceae 科細菌の一部に、チオ硫酸酸化能とそれを担う *sox* locus I が分布していることが明らかになった。また、チオ硫酸酸化能を示した菌株は、*B. japonicum* USDA110 株と同様に、4 mM 以下と低濃度のチオ硫酸酸化能を示した。供試した Bradyrhizobiaceae 科細菌の 16S rRNA 遺伝子に基づいて系統樹を作製し、チオ硫酸酸化能の有無と系統の相関を調べた。その結果、*sox* locus I 依存的なチオ硫酸酸化能を持つ菌株は、呼吸（水素酸化、亜酸化窒素還元）に関わる遺伝子も同時に持つことが示され、呼吸に関わる遺伝子の有無と系統の位置に相関があることが示された。

B. japonicum USDA110 株および *B. japonicum* USDA122 株は、水素を電子供与体、二酸化炭素を炭素源とする化学独立栄養を行うことが分かっている (Evans *et al.* 1980、Mayer. 1980)。ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA122 株では、水素を電子供与体とする化学独立栄養で、ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase 活性が検出さ

れている (Lepo *et al.*, 1980)。また、*B. japonicum* USDA110 株では、従属栄養と比較し、水素を電子供与体とする化学独立栄養で培養した細胞で、ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RuBisCO) をコードする *cbbLS* 遺伝子の遺伝子発現の上昇が観察されている (Franck *et al.*, 2008)。以上の結果より、*B. japonicum* USDA110 株および *B. japonicum* USDA122 株の、水素を電子供与体とする化学独立栄養での二酸化炭素固定には、*cbbLS* 遺伝子がコードする RuBisCO が関わっていると考えられている。しかし、遺伝子破壊による直接的な証拠は得られていない。また、水素を電子供与体とする化学独立栄養では、5% (v/v) と高濃度の二酸化炭素を添加して培養しているのに対し (Evans *et al.*, 1980)、チオ硫酸を電子供与体とする本研究では、特に二酸化炭素を添加していない空気で培養している。*B. japonicum* USDA110 株の RuBisCO の K_m 値は低いため (Badger and Bek., 2008)、*B. japonicum* USDA110 株が、RuBisCO により大気中の極めて低い二酸化炭素を炭素源として利用できるかは定かでない。

チオ硫酸を電子供与体とする空気中での化学合成無機栄養条件下での二酸化炭素固定能の有無を、 ^{14}C 投与試験により解析した。その結果、*B. japonicum* USDA110 株は、空気中の低濃度の二酸化炭素を固定し、また、その固定量はチオ硫酸依存的に増加することを示した。

チオ硫酸を電子供与体とする空気での化学独立栄養条件下における、二酸化炭素固定に関わる遺伝子の同定を試みた。その方法として、RuBisCO の Large subunit をコードしている *cbbL* 遺伝子の破壊株を作製し表現型を観察した。その結果、*cbbL* mutant は、チオ硫酸を電子供与体とする空気中での化学独立栄養では、細胞増殖およびチオ硫酸酸化は認められなかった。しかし、空気に 5 % (v/v) の二酸化炭素を添加したチオ硫酸を電子供与体とする化学独立栄養条件においては、*cbbL* mutant はわずかなチオ硫酸酸化を示した。また、水素を電子供与体とする化学独立栄養条件においても、*cbbL* mutant はわずかなコロニー形成を示した。したがって、*B. japonicum* USDA110 株の二酸化炭素固定には、*cbbL* 遺伝子が主要な役割を果たしているが、5 % (v/v) の二酸化炭素存在下では、*cbbL* 遺伝子以外の二酸化炭素固定遺伝子が関わっている可能性が考えられた。

以上の結果より、ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株における、低濃度域のチ

チオ硫酸を電子供与体、空気中の二酸化炭素を炭素源とする化学独立栄養生育を明らかにした。また、チオ硫酸酸化には *soxY* 遺伝子が、二酸化炭素固定には *cbbL* 遺伝子が少なくとも必須であることが示された。また、*sox* locus I 依存的なチオ硫酸酸化能は、*Bradyrhizobiaceae* 科細菌の一部に分布していることが明らかになった。

B. japonicum USDA110 株が生息する田畑などの土壌環境下でのチオ硫酸濃度は極めて低く、*B. japonicum* USDA110 株が酸化できる濃度の範囲である。したがって、*B. japonicum* USDA110 株が、土壌環境下での生存戦略の一つとして、チオ硫酸酸化によるエネルギー獲得系を利用している可能性が示唆された。また、田畑でのイオウ酸化にダイズ根粒菌が関与している可能性が考えられた。

多くの細菌は、電子供与体および炭素源としてアミノ酸や有機酸、芳香族化合物など様々な有機化合物を利用する従属栄養（Heterotroph）である。しかし、一部の細菌は電子供与体として無機化合物、炭素源として二酸化炭素を利用する化学独立栄養（Chemolithoautotroph）能を持つ。無機イオウ化合物を電子供与体とする化学独立栄養に関する研究は、極限環境細菌を対象として遺伝学的および生化学的な研究が進んでいるが、いわゆる通性化学独立栄養（Facultative Chemolithoautotroph）についてはほとんど解明されていない。

本研究では、(1) ダイズ根粒菌 *B. japonicum* USDA110 株のゲノム情報を用いた無機イオウ化合物酸化に関わる *sox* ホモログの探索、(2) *B. japonicum* USDA110 株のチオ硫酸酸化能と、チオ硫酸酸化に関わる *sox* ホモログの解析、(3) *Bradyrhizobiaceae* 科細菌におけるチオ硫酸酸化能と *sox* ホモログの分布、(4) チオ硫酸を電子供与体とする化学合成無機栄養条件下での二酸化炭素固定能の解析を行った。その結果、全ゲノム塩基配列情報に基づいた、機能ゲノミクス研究を行い、*soxY_I* が低濃度特異的なチオ硫酸酸化を担っているという明快な結論を得ることができた。さらに、*Bradyrhizobiaceae* 科細菌に機能する *sox* 遺伝子群が広く分布していること、化学独立栄養生育条件では、細胞レベルでチオ硫酸酸化が呼吸系や CO₂ 固定(*cbbL*)とカップルしていることも明らかにした。

今までの細菌の硫黄酸化の研究は、温泉など極限環境から分離された細菌を材料とされてきたが、増田幸子氏の研究は低濃度の無機硫黄化合物とをエネルギー源、低濃度 CO₂ を炭素源として化学独立栄養生育が起きることを、ダイズ根粒菌とその近縁菌ではじめて明らかにした。現在世界中で 1000 株以上の細菌ゲノムが公表されているが、ゲノム情報から新規生物機能を見いだした数少ない良い研究である。

以上の研究は、全て申請者が一人で行った。増田幸子氏は First author として 2 報発表しているが、いずれも博士論文を構成する内容となっている。これらの論文は、発表後 1 年以内に、他の研究グループによる光合成細菌の水素生産に低濃度チオ硫酸が利用できることの発見や、カビに共生している近縁細菌のイオウ酸化への関与などの波及効果を生み出している。

以上の論文内容は、増田幸子氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、審査員一同、増田幸子氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認めた。